

9:30~11:45 オーラルセッション (C会場)

9:15~9:30 接続テスト

9:30~10:30 座長：千田 美紀 (高エネルギー加速器研究機構)

OC-I-01 植物型フェレドキシンの酸化還元に伴う構造変化とその役割

○大西 裕介・田中 秀明・栗栖 源嗣 (阪大蛋白研)

OC-I-02 構造から見たチトクロム酸化酵素のH-経路を介したプロトン能動輸送機構の普遍性

島田敦広・○月原富武・吉川信也 (岐阜大応用生物・兵庫県立大生命・阪大蛋白研)

OC-I-03 NADH-シトクロム b_5 還元酵素の結晶構造解析

○平野優・栗原和男・日下勝弘・Andreas Ostermann・木村成伸・三木邦夫・玉田太郎
(量研量子生命・JSTさきがけ・茨城大iFRC・TUM FRM-II・茨城大院理工・京大院理)

OC-I-04 TGF- β シグナル伝達系の主要転写因子SMAD2/3による補因子の選択機構及びその制御

○宮園健一・和田ひかる・森脇沙帆・大野陽介・伊藤友子・深津由衣・栗崎晃・浅島誠・田之倉優
(東大院農生科・奈良先端大先端科学技術・産総研)

10:30~10:45 接続テスト

10:45~11:45 座長：松垣 直宏 (高エネルギー加速器研究機構)

OC-I-05 クライオ電子顕微鏡を利用した3次元微結晶構造解析

○高場 圭章・眞木 さおり・米倉 功治 (理研 SPring-8)

OC-I-06 強度クラスタリング法を利用した蛋白質複合体の結晶内構造多型の同定

○藤間祥子・端山浩輝・松浦 滉明・坂井直樹・平田邦生・松谷優輝・清水光・大畑慎也・林有吾・山崎洋一・堅田利明・
清水敏之・上久保裕生

(奈良先端大先端科学技術・奈良先端大先端科学技術・理研 放射光科学研究センター・理研 放射光科学研究センター・理研 放射光科学研究センター・東京大学院薬・東京大学院薬・武蔵野大学薬・奈良先端大先端科学技術・奈良先端大先端科学技術・武蔵野大学薬・東京大学院薬・奈良先端大先端科学技術)

OC-I-07 複数のエピトープと結合するモノクローナル抗体の認識機構 —クラスター状結晶からの構造解析—

○小林 淳・小澤 龍彦・正木 秀幸・加藤 龍一 (高エネ研物構研構造生物・富山大医・近畿大生物理工)

OC-I-08 B細胞抑制因子CD72のクラスター結晶からの構造決定

○沼本修孝・平田邦生・鏑田武志・伊藤暢聡 (医科歯科大難研・理研RSC)

OC-I-01

植物型フェレドキシンの酸化還元に伴う構造変化とその役割

○大西 裕介、田中 秀明、栗栖 源嗣
(大阪大学蛋白質研究所)

植物型フェレドキシン (Fd) は [2Fe-2S] 錯体を持つ電子伝達蛋白質である。葉緑体のストロマに存在する Fd は光化学系 I から電子を受け取り、Fd-NADP⁺還元酵素などの Fd 依存酵素へ電子を分配する。植物型 Fd は酸化還元により錯体近傍の特定のペプチド結合がフリップすることがわかっているが、その生理学的な役割は不透明であった。そこで我々は、植物型 Fd (*Te*Fd) の酸化型・還元型についてこれまでよりも厳密に構造解析を行った。酸化型については、X線による還元を抑えるために SPring-8 の BL41XU の高エネルギーX線を活用し、さらに6つの同型な酸化型 Fd 結晶を用いてフルデータセットを収集することで、X線ドーズを 300 kGy 未満に抑えつつ 0.78 Å 分解能で構造を決定した。還元型については、Fd 結晶をほぼ完全に還元するような還元剤ソーキングの条件を検討し、0.77 Å 分解能で構造を決定した。これらの構造の比較により、ペプチド結合のフリップの

他に、Ser46 や Phe64 といった植物型 Fd の活性や電位の保持に重要な残基の移動が酸化還元に伴って起こることを初めて示した。そこで、これらの残基をアラニンに置換した変異体について酸化型・還元型構造を決定した結果、ペプチドのフリップは同様に起こっており、このフリップが Ser46・Phe64 の構造変化の起点となることがわかった。一連の構造変化は、特に還元型構造において錯体の歪みや Ala44-Phe64 間の反発を生んでおり、植物型 Fd が他の [2Fe-2S] Fd に比べて酸化還元電位が低い理由をよく説明していた。

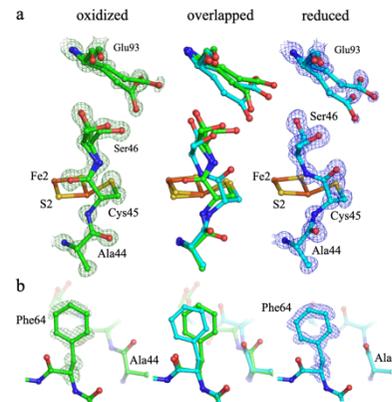


図 1. 本研究により得られた Cys45 周辺(a)及び Phe64 周辺(b)における酸化型・還元型 Fd のモデル及び 2Fo-Fc マップ (1.5 σ)。両モデルの向きは全 α 炭素原子の座標を基に合わせている。

OC-I-02

構造から見たチトクロム酸化酵素の H-経路を介したプロトン能動輸送機構の普遍性

島田敦広¹、〇月原富武^{2,3}、吉川信也²

(¹ 岐阜大応用生物、² 兵庫県立大生命、³ 阪大蛋白研)

チトクロム酸化酵素(CcO)は呼吸によって得た酸素を水にまで還元する。図に示すようにその活性中心には、CuA、ヘム a、ヘム a₃、CuB がある。酸素還元の際に電子が CuA からヘム a を経てヘム a₃ に移動する際に、プロトンが N-側から P-側に能動輸送されて、P-側にプロトンを蓄積する。こうして蓄積されたプロトンが生命活動を支えるエネルギーとなる。CcO はこの酸素還元とプロトン能動輸送の共役を比類のない微細で精緻な構造変化によって制御している。

我々はウシ CcO の X 線結晶構造解析を行い、H-経路を介したプロトン能動輸送機構を提案している。図で水色と赤色からなる矢印付きの線が H-経路を示しており、下半分の水色の部分は一連の空洞で構成される構造で、水チャンネルと言う。この水チャンネルを介して、水色で示したプロトンプールに 4 プロトン蓄積する。黄色の螺旋構造はヘリックス X であり、この構造は酸素がヘム a₃ 部位に入ると、ヘム a₃ の微細な並進によって変化する。このヘリックス X の構造変化は水チャンネルの一部の空洞を消滅させて、プロトンの移動を止める。一方赤色で示す上半分は水素結合ネットワークと呼んでいる。酸素がヘム a₃ に入った後、4 回 CuA からヘム a を経てヘム a₃ に電子が移動する。1 電子が移動するたびにプロトンプールから水素結合ネットワークを介してプロトンが P-側に輸送される。

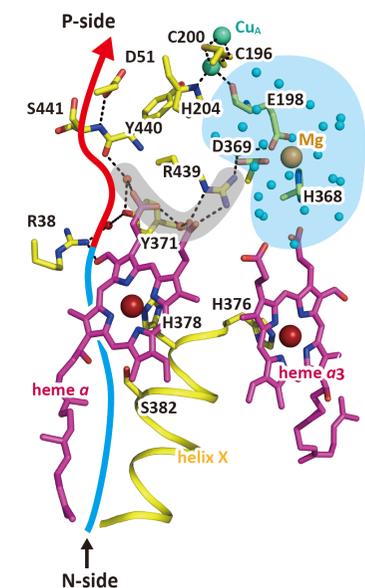
この我々の提唱する機構に対して主に細菌の CcO 研究に基づいた根強い反論があり、別の機構を提案し

ている。その根拠は H-経路にあるアミノ酸の部位特異的変異体が機能変化をもたらさないことにある。しかし、細菌の CcO の部位特異的変異体の構造モデルを作成したところ、いずれの変異体も水チャンネルや水素結合ネットワークを損傷するものではなかった。即ち、これらの変異体で H-経路の役割を否定できない。

H-経路の水チャンネルの空洞に N-側から水が入ってくることは不可能であると理論計算結果も示された。しかし、当時我々が既に公表していた構造には空洞部分に水があり、この実験事実を考慮しないで議論している。

H-経路説のもう一つの特徴は分子内部で浸水性に富んだプロトンプールである。ここには 13 のプロトン化可能な残基があり、それら全てが哺乳類と細菌で保存されている。このプール形成に重要な役割を果たす 5 残基の Pro も両方で保存されている。また水チャンネルの開閉を制御するヘリックス X の構造変化も両方で変わらない。

以上、H-経路を介したプロトン能動輸送機構は哺乳類のみならず、細菌にも当てはまる普遍的な機構であろう。



NADH-シトクロム b_5 還元酵素の結晶構造解析

○平野優^{1,2}、栗原和男¹、日下勝弘³、Andreas Ostermann⁴、
木村成伸⁵、三木邦夫⁶、玉田太郎¹
(¹量研量子生命、²JST さきがけ、³茨城大 iFRC、
⁴TUM FRM-II、⁵茨城大院理工、⁶京大院理)

NADH-シトクロム b_5 還元酵素 (b5R) は FAD を補欠分子族として結合する酸化還元酵素で、2 電子供与体である NADH から 1 電子受容体であるシトクロム b_5 (b_5) への電子伝達反応を担っている。電子伝達反応の過程において b5R は二電子還元型、一電子還元型など複数の酸化還元状態を取ることが知られている。この b5R の酸化還元反応サイクルにおいてはヒドリドイオン (H^-) とプロトン (H^+) の移動を伴っている。そのため、水素原子を含めた高分解能立体構造情報を取得することは、b5R の酸化還元反応サイクルの理解に必要不可欠である。

これまでブタ肝臓由来の b5R において、酸化型については 0.78 Å 分解能、還元型については 1.68 Å 分解能の X 線結晶構造が報告されている[1-3]。本研究では、b5R における水素移動経路を理解するため酸化型については中性子構造解析を行い、還元型については 1 Å 分解能

を超える高分解能 X 線構造解析を行った。酸化型 b5R は 2 種類の pH 条件で作製した結晶を用い中性子構造解析を行った結果、FAD 周辺の水素結合ネットワークに立体構造変化が見られた。還元型 b5R については、野生型と一電子還元型を安定化する変異体の結晶を作製し X 線構造解析を行った結果、FAD および NADH 周辺に立体構造変化が観測された。以上の中性子構造解析と X 線構造解析の結果から、水素移動反応に重要であると考えられる立体構造情報を取得することができた。

参考文献 [1] H. Nishida *et al.*, *Biochemistry*, 34, 2763-2767 (1995). [2] M. Yamada *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 425, 4295-4306 (2013). [3] K. Takaba *et al.*, *Sci. Rep.*, 7, 43162 (2017).

OC-I-04

TGF-β シグナル伝達系の主要転写因子 SMAD2/3 による 補因子の選択機構及びその制御

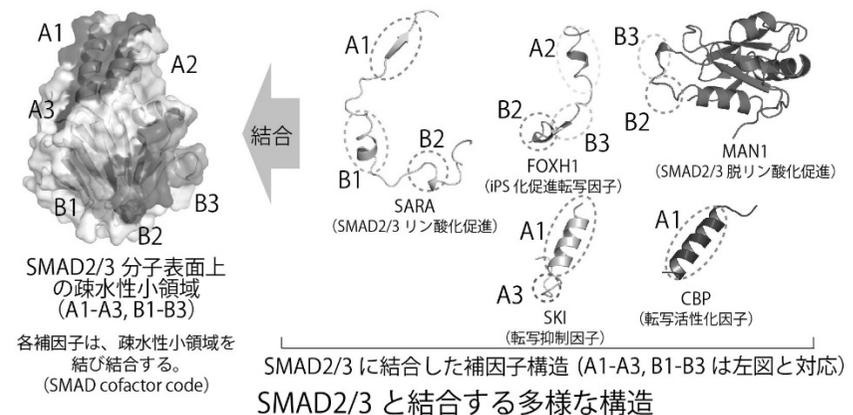
○宮園健一¹、和田ひかる¹、森脇沙帆¹、大野陽介¹、
伊藤友子¹、深津由衣²、栗崎晃^{2,3}、浅島誠²、田之倉優¹

(¹東大 大学院農学生命科学研究科、²奈良先端大 先端科学技術研究科、³産総研)

TGF-β は、細胞の様々な機能を調節するサイトカインである。TGF-β の刺激を受けた細胞は、その刺激を転写因子 SMAD2/3 のリン酸化へと変換し、多様な遺伝子発現の制御を行う。SMAD2/3 の機能は多くの別のタンパク質（補因子）との直接的な結合によって制御されているが、これらの補因子の間には、共通する SMAD2/3 結合モチーフが存在しておらず、SMAD2/3 と補因子の間にみられる 1 対多の相互作用がどのような基盤に基づいて起こるのかは不明であった。TGF-β のシグナルは、がんの浸潤や転移を引き起こす主要な要因であり、その新規阻害法の開発を目指して SMAD2/3-補因子間の相互作用解明とその制御を目指した研究を進めている。

これまでに、SMAD2/3 と転写活性化因子 CBP、転写抑制因子 SKI、転写因子 FOXH1、脱リン酸化促進因子 MAN1 の複合体構造を決定することに成功している。得られた

複合体構造を精査すると、SMAD2/3 の分子表面上には補因子結合性の疎水性小領域が複数存在しており（A1-A3, B1-B3：下図）、各補因子はそれらの 1 つないし複数を利用することによって、SMAD2/3 に対して結合するという新たな機構が明らかになった。また、この小領域の機能を阻害することによって TGF-β シグナルを抑制することも明らかになり、この分子間接触は、がん治療における創薬ターゲットとなることが期待される。



OC-I-05

クライオ電子顕微鏡を利用した3次元微結晶構造解析

○高場 圭章、眞木 さおり、米倉 功治
(理研 SPring-8)

クライオ電子顕微鏡を利用した単粒子解析法は高分子複合体の構造解析を飛躍的に加速させつつある。他方、電子線回折による3次元結晶構造解析はより小さな分子を対象とし、 μm 以下の微結晶領域から分解能 1 \AA を超える回折像の取得が可能である。そのため難結晶性有機分子の構造決定や、結晶性材料分子の微小領域構造分析に有効と考えられる。また、電子散乱は試料のクーロンポテンシャルに依存するため、電荷情報が抽出できる期待がある。

発表者らはクライオ電子顕微鏡 CRYO ARM 300 を使用した電子線回折測定系の構築と高度化を進めてきた。同機は 300 kV 加速電圧および冷陰極電界放出型電子銃を備え、高分解能データの測定特性に優れる。また、より迅速な構造決定を目指し、回折像収集およびデータ処理を自動化しつつある^[1]。

分子電荷情報を得るためには精密な密度解釈が必要であるが、電子線回折に対するモデルは現状 X 線回折ほ

どの精度が得られていない。本発表では有機化合物やペプチド分子の電子線構造解析例を示しつつ、電荷決定の可能性と課題について議論する。

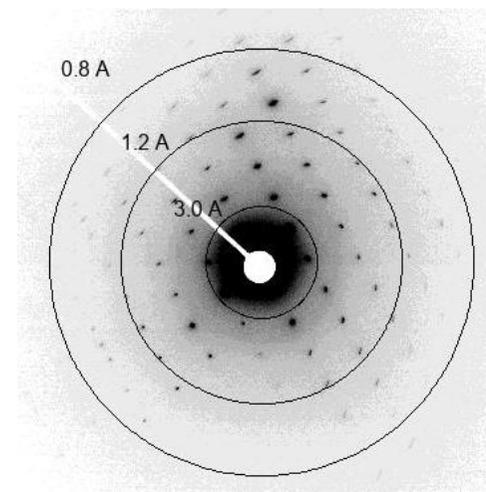


図1. 導電性有機分子結晶の電子線回折像。
 $\lambda=0.0197 \text{ \AA}$. $0.8, 1.2, 3 \text{ \AA}$ の同心円は $\text{CuK}\alpha$ X 線
($\lambda=1.54 \text{ \AA}$) の場合の $2\theta=149, 80, 30^\circ$ 相当。

[1] K. Takaba, S. Maki-Yonekura, K. Yonekura, *J. Struct. Biol.*, 2020.

強度クラスタリング法を利用した
蛋白質複合体の結晶内構造多型の同定

○ 藤間祥子¹, 端山浩輝¹, 松浦 滉明², 坂井直樹²,
平田邦生², 松谷優輝³, 清水光³, 大畑慎也⁴, 林有吾¹, 山崎洋一¹,
堅田利明⁴, 清水敏之³, 上久保裕生¹

(1. 奈良先端大先端科学技術, 2. 理研 放射光科学研究センター,
3. 東京大学院薬, 4. 武蔵野大学薬)

生体内で働く多くの情報伝達蛋白質は、翻訳後修飾などにより機能を付加され、離合集散し働く。一般的に、このような蛋白質の相互作用は、特異的である一方弱く、高分解能かつ高専有率のリガンド複合体構造決定に苦戦する。そこで、プログラム KAMO⁽¹⁾を用いた強度クラスタリング法を利用し、結晶内に存在する構造多型の抽出、高分解能化を目指し研究を行った。

アルマジロリポートを有する GEF(SmgGDS)と RhoA 複合体解析では、ほぼ同条件の多数の結晶からデータを収集し、結晶間でリガンド脂質の結合フォームが異なることを見出し、3.5Åで脂質結合型 RhoA との複合体構造決定に成功した⁽²⁾。ヒートリポートを有する核内輸送受容体と積荷ペプチド複合体解析では、ヘリカ

ルスキャン測定データを振動角(30°)で分割し、データセットを再構築することで、3.5Å分解能の複合体構造を決定した。結果、積荷が2つの異なる様式で核内輸送受容体に結合することを見出した。得られた構造の妥当性は、変異体実験により評価した。

(1) K. Yamashita, *et al.*: *Acta Cryst. D.*, **74** (2018) (2) H. Shimizu, *et al.*: *P.N.A.S.*, **115**, 38 (2018)

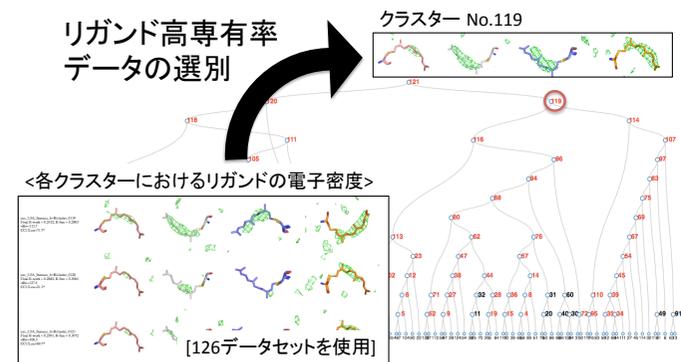


図1. 強度クラスタリング法によるデータ選別.

OC-I-07

複数のエピトープと結合するモノクローナル抗体の認識機構 —クラスター状結晶からの構造解析—

○小林 淳¹、小澤 龍彦²、正木 秀幸³、加藤 龍一¹

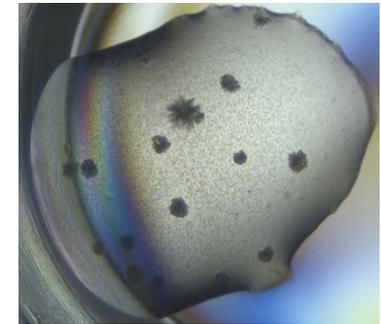
(¹高エネ研・物構研・構造生物、²富山大・医、³近畿大・生物理工)

ウエストナイルウイルス (WNV) は、ウエストナイル熱や稀に致死性の脳炎を引き起こすフラビウイルス科の蚊媒介性ウイルスで、世界の広い地域に分布している。我々は、同じフラビウイルス科の日本脳炎ウイルス (JEV) と WNV の双方を中和するモノクローナル抗体#83 を見出した。本来1つのエピトープしか認識しないモノクローナル抗体が、どのようにして複数のエピトープと結合するかを明らかにするため、X線結晶構造解析を行った。

抗体#83 は、Fab 化して哺乳類細胞で発現させ精製を行った。ELISA により、抗体#83 のエピトープは WNV のエンベロープ (E) タンパク質の第 3 ドメインにあることを明らかにし、その部分を大腸菌で発現させ精製を行った。精製標品を混合後、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより複合体画分のみを回収し、結晶化を行った。

単結晶は得られなかったがクラスター状結晶 (右図) を再現性よく得ることができた。このクラスター状結晶

に 30% Glycerol を添加して凍結し、SPring-8/BL41XU の自動測定システムにより回折データを収集した。1つのループに1つのクラスター状結晶を拾い、ビームサイズを $9 \times 10 \mu\text{m}$ 、露光



点間の距離を $15 \mu\text{m}$ として 16 個の結晶について 10° ずつ small wedge データを収集した。最終的に $10^\circ \times 100$ 個のデータを KAMO でマージして 2.5 \AA 分解能のデータを得た。Phaser により初期位相を決定し、Phenix と Coot により $R_{\text{work}}/R_{\text{free}} = 20.5/25.7\%$ まで精密化を行った。

得られた結晶構造で、抗原は Fab#83 の相補性決定領域に結合していた。Fab#83 は抗原の N 末端主鎖と Arg388 側鎖と強く相互作用していた。Arg388 は JEV にも保存されており、この Arg 残基が WNV と JEV の 2 種類の抗原を認識する主な原因であることが強く示唆された。

OC-I-08

B 細胞抑制因子 CD72 のクラスター結晶からの構造決定

○沼本 修孝¹、平田 邦生²、鰐田 武志¹、伊藤 暢聡¹
(¹ 医科歯科大難研、² 理研 RSC)

自己免疫疾患は、体内で抗体産生を担う B 細胞が自己由来の核酸などに応答し、自己抗体を産生することが原因のひとつである。われわれは B 細胞上に発現している抑制性の補助因子 CD72 に着目し、代表的な自己免疫疾患である全身性エリテマトーデスの発症を抑制していることを示した[1]。CD72 のリガンド結合ドメインは、C 型レクチン様ドメインのスーパーファミリーに属する分子量約 15 kDa ほどの小型のドメインである。自己免疫疾患のモデルマウスにおける CD72 のリガンド結合ドメインの結晶構造解析を目指して結晶化を試みたものの、様々な条件最適化の努力にもかかわらず、良質な単結晶を得ることができず、大型のクラスター結晶が得られるのみであった (図 1)。

近年、大型放射光施設 SPring-8 では微小な結晶からでも構造解析ができるよう、マイクロフォーカスビームと自動測定、自動解析システムを組み合わせたデータ収集法が整備された。当初は、多数の微小な単結晶

からのデータ取得を念頭におかれていたものと考えられるが、図 1 のような大型のクラスター結晶を、多数の微小結晶の集まりと考え、同様の手法でデータ収集を試みた。SPring-8 BL32XU の微小ビーム ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) を用い、14 個のクラスター結晶からひとつあたり 100 箇所それぞれ 10 度分の small wedge データを取得し、合計 1,400 セットの回折データをクラス分けし、一致度の良いものを選択して merge することで、最終的に 2.5 Å 分解能で構造解析を行うことができた。

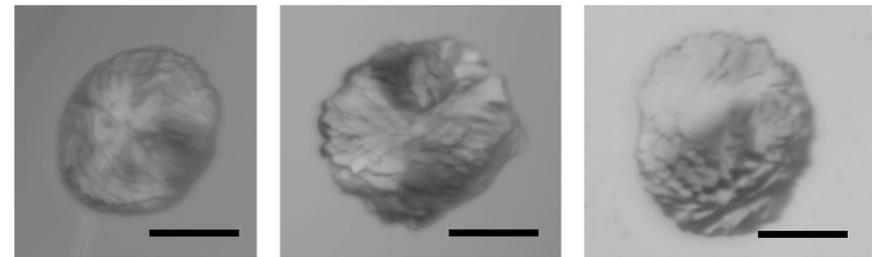


図 1 . CD72 のクラスター結晶。スケールバーは 200 μm 。

[1] Akatsu *et al.*, *J. Exp. Med.*, **213**, 2691-2706, 2016.